

淡水魚類の雌性化技術開発

染色体工学手法によるアユの雌性発生—I

高橋 昭夫

近年、魚類の染色体の倍数性を利用する育種技術として卵の染色体を操作し、雌性発生を誘発する研究がサケ、マス類^{1,2}ニシキゴイ³、ドジョウ⁴で行われている。これらの手法を基にしてアユの雌性発生を可能にする条件を検討するため試験を実施した。

材料及び方法

試験に用いたアユ親魚は当场で人工採苗し親魚に養成したもので、精子は成熟した雄魚から搾出法により、卵は排卵後24時間以内の雌魚から搾出法により採取した。媒精後の卵はスライドグラス上に付着、吸水させてから処理した。

精子の運動性の確認は、顕微鏡下のスライドグラス上に精液を滴下後0.1 MNaCl液を加え混合して行った。

以下に試験方法について述べる。

精子不活化：搾取した精液は適量をKcl 強化リンゲル液で100倍に希釈し、予め上記のリンゲル液で1,000倍に希釈したドライウエール液で親水処理し準備しておいた内径9cmのガラスシャーレ内に3cc滴下後、紫外線を照射して不活化を図った。紫外線照射は紫外線照射装置（紫外線ランプGL-10、3灯）を使い、照射距離35cmに固定して、30秒後から30秒間隔に240秒まで8段階を設けて照射量の検討を行った。なお、照射後の精液は精子の活動性をチェックした。

不活化の確認は、照射精液に正常なアユ卵に媒精し、その後の生残率（孵化率）及び半数体症候群発生率（奇形発生率）によって行った。

染色体の倍数化：不活化精子で媒精した卵に温度刺激を与え第2極体の放出を阻止し染色体の倍数化を図った。

温度刺激には低温恒温水槽を用い、刺激水温を0°C（低温区）と30°C（高温区）とし、低温区では刺激の時間と時期を検討するため、受精5分後の卵に10、20、30、35、40、45、50、55、60、70、80分及び90分刺激する区と、刺激時間を60分として刺

激開始を受精の2分後から1分間隔に13分後までにする区で行った。高温区では刺激時間の検討として受精の5分後に20、30、35、40、45、50、55分および60分刺激する区で行った。なお、対照区として通常の精子で受精し温度刺激を与えないで通常発生区を設けた。

倍数化の確認は生残率および半数体症候群発生率によった。

結果と考察

精子不活化：紫外線照射距離を35cmとして照射時間をかえることによって照射量を変えて行った結果を第1表と第1図に示した。

生残率は通常の精子で受精した対照区は83.8%と高率であったが、照射量が1,950 ergs/mm²と低いA-1区は1%以下で照射量が増えると共に生残率は高くなり7,800 ergs/mm²（A-4区）照射で26.7%ともっとも高く、その後は逆に照射量が増すごとに低くなり、13,650 ergs/mm²（A-7区）で0%となった。

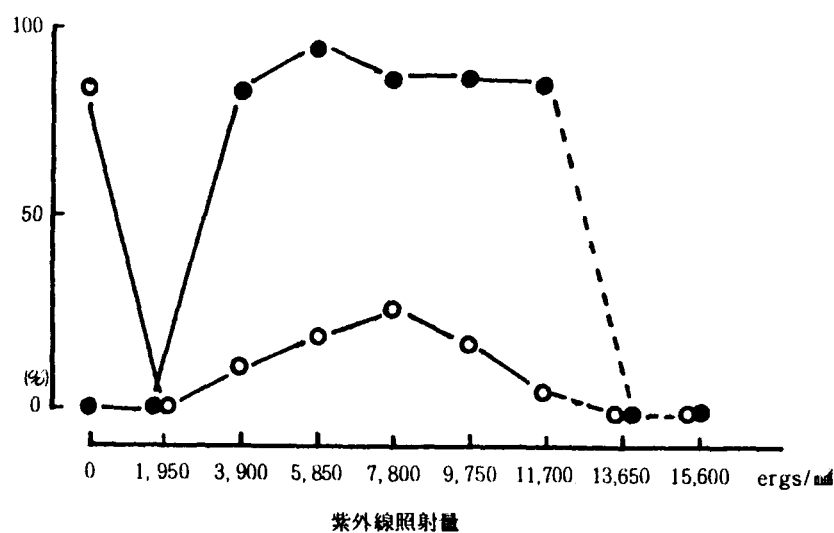
半数体症候群発生率は対照区が0%であったがA-2区からA-6区までは85%以上の高率であった。このことは照射量が3,900～11,700 ergs/mm²で精子を不活化できることを示しており、生残率との関係から5,850～7,800 ergs/mm²が有効であり谷口・他の4,815～9,630 ergs/mm²が有効との報告と本試験はほぼ一致した。しかし、半数体症候群発生率が谷口・他では6,420 ergs/mm²で100%に達するとしているが、本試験ではもっとも高い5,850 ergs/mm²で94.2%と、100%に達していないため、精子希釈率及び照射精液量についてさらに検討する必要がある。

染色体の倍数化：低温刺激により第2極体の放出を阻止し卵の染色体を倍数化するため受精の5分後に10～90分の処理により刺激時間を変えて行った結果を第2表と第2図に示した。

生残率は低温処理していないB-1区が21.0%で、処理した区では10分処理のB-2区は4.7%と低い

第1表 紫外線照射によるアユ精子の不活化試験結果

項目 \ 区	対 照	A—1	A—2	A—3	A—4	A—5	A—6	A—7	A—8
照 射 距 離 (cm)	—	35	35	35	35	35	35	35	35
照 射 時 間 (秒)	—	30	60	90	120	150	180	210	240
照射線量(ergs/mm ²)	0	1,950	3,900	5,850	7,800	9,750	11,700	13,650	15,600
精 子 活 力	+	+	+	+	+	+	+	+	±
受 精 卵 数 (粒)	650	620	650	560	750	460	410	260	360
発 眼 率 (%)	85.4	8.2	41.3	74.8	59.2	57.0	35.0	3.0	0
ふ 化 尾 数 (尾)	545	1	73	104	200	78	20	0	0
生 残 率 (%)	83.8	0.007	11.2	18.6	26.7	17.0	4.9	0	0
半数体症候群 発 生 尾 数 (尾)	0	0	62	98	172	67	17	—	—
半数体症候群 群 生 率 (%)	0	0	84.9	94.2	86.0	85.9	85.0	—	—

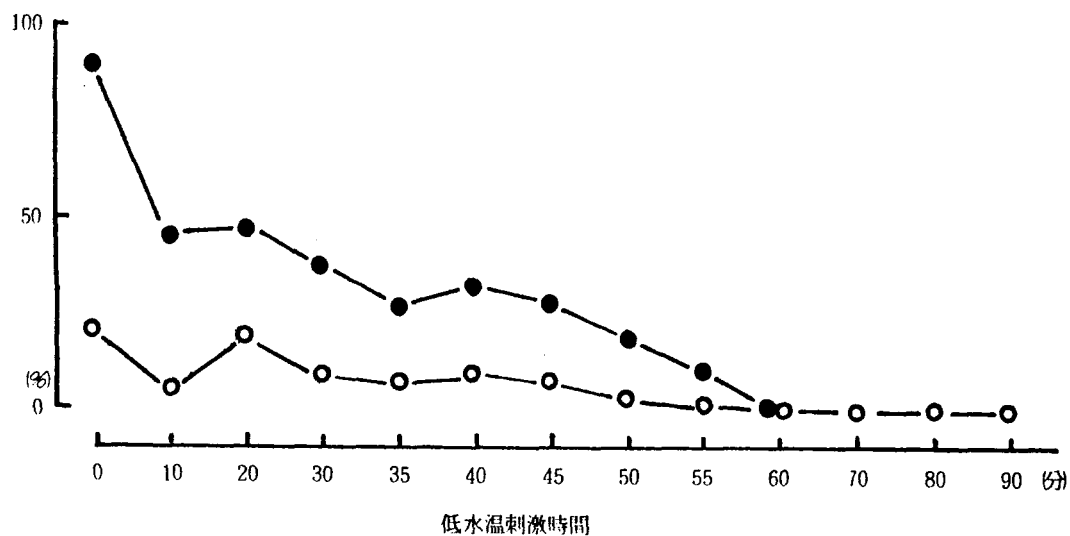


第1図 紫外線照射された精子で媒精したアユ卵の生残率（ふ化率）（○）および半数体症候群発生率（●）

第2表 低温刺激時間の違いによるアユ卵の染色体倍数化試験結果

項目 \ 区	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9	B-10	B-11	B-12	B-13
刺激温度 (°C)	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
刺激時間 (分間)	—	10	20	30	35	40	45	50	55	60	70	80	90
刺激時期 (分間)	—	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
受精卵数粒	780	470	760	930	730	800	700	750	600	700	700	600	600
発眼率 (%)	49.1	12.6	28.9	18.1	15.9	16.6	17.4	8.4	7.8	4.5	4.4	4.3	3.5
ふ化尾数尾	164	22	145	90	55	72	52	22	10	5	0	0	0
生残率 (%)	21.0	4.7	19.1	9.7	7.5	9.0	7.4	2.9	1.7	0.7	0	0	0
半数体症候群発生尾数尾	147	10	69	34	15	23	15	4	1	0	—	—	—
半数体症候群発生率 (%)	89.7	45.5	47.9	37.8	27.3	31.9	28.8	18.2	10.0	0	—	—	—

(注) 精子は紫外線を 7,800 ergs/cm² 照射して不活化した。

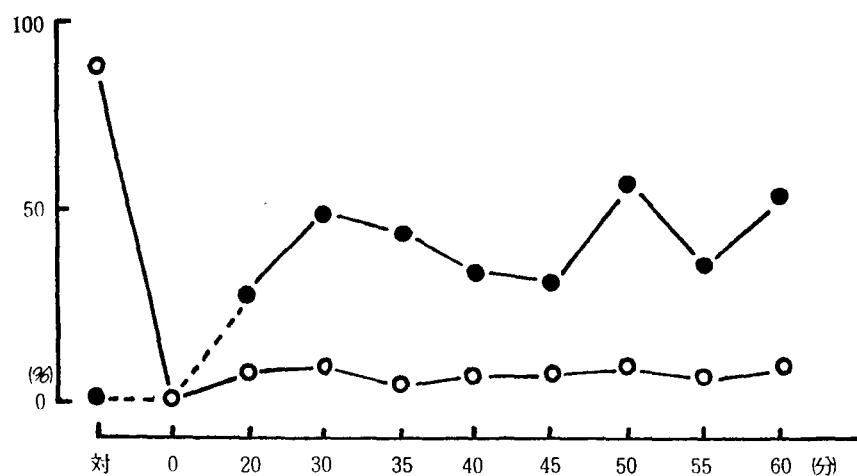


第2図 紫外線照射された精子で媒精したアユ卵の媒精5分後の低水温 (0°C) 刺激時間別生残率 (ふ化率) (○) および半数体症候群発生率 (●)

第3表 低温刺激時期の違いによるアユ卵の染色体倍數化試験結果

項目\区	対 照	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12
刺 激 温 度 (°C)	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
刺激時間 (分間)	—	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
刺激時期 (分後)	—	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
受 精 卵 数 粒	600	700	600	400	400	700	600	800	700	500	450	500	700
発 眼 率 (%)	71.8	1.9	1.5	4.8	5.5	2.3	2.0	2.4	1.0	1.4	1.6	2.6	1.4
ふ 化 尾 数 (尾)	255	1	5	0	9	3	1	0	0	0	0	0	0
生 残 率 (%)	42.5	0.1	0.8	0	2.3	0.4	0.2	0	0	0	0	0	0
半数体症候群 発 生 尾 数 (尾)	0	0	0	—	0	0	0	—	—	—	—	—	—
半数体症候群 発 生 率 (%)	0	0	0	—	0	0	0	—	—	—	—	—	—

(注) 対照区は不活化していない精子で媒精し、その他の区の精子は紫外線を7,800 ergs/mm²照射して不活化した。



第3図 紫外線照射された精子で媒精したアユ卵の媒精5分後の高水温(30°C)刺激時間別生残率(ふ化率)(○)および半数体症候群発生率(●)

20分処理したB-3区で19.1%とB-1区とはほぼ同じまでになった。しかし、30分処理したB-4区以降は刺激時間が長くなるにつれて生残率は低くなり、70分処理したB-10区で0%になった。

半数体症候群発生率はB-1区が89.8%と高く、処理した区では刺激時間の短いB-2区、B-3区が45%以上と高いが、刺激時間が長くなるにつれて発生率も低くなりB-10区で0%となった。低温刺激時期を検討するため受精の2~13分後に60分間の処理を行っ

た結果を第3表に示した。

それらの生残率は対照区が42.5%であったが、処理した区は各区とも低く、5分後に処理したC-4区が2.3%と最も高く、8分後に処理したC-7区以降は0%であった。

半数体症候群発生は各区とも見られなかった。

高温刺激では受精の5分後に20~60分間の処理により刺激時間を変えて行った結果を第4表と第3図に示した。

第4表 高温刺激によるアユ卵の染色体倍数化試験結果

項目\区	対 照	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7	D-8	D-9
刺 激 温 度 (℃)	—	—	30	30	30	30	30	30	30	30
刺激時間 (分間)	—	—	20	30	35	40	45	50	55	60
刺激時期 (分後)	—	—	5	5	5	5	5	5	5	5
受 精 卵 数 (粒)	900	950	820	950	1,000	950	950	800	950	800
発 眼 率 (%)	96.1	12.1	26.1	28.0	29.8	29.3	28.1	38.0	30.2	33.9
ふ 化 尾 数 (尾)	794	0	66	85	56	70	67	91	68	76
生 残 率 (%)	88.2	0	6.9	8.9	5.6	7.4	7.1	9.6	7.2	9.5
半数体症候群 発生尾数 (尾)	0	—	19	42	25	24	21	53	25	41
半数体症候群 発生率 (%)	0	—	28.8	49.4	44.6	34.3	31.3	58.2	36.8	53.9

(注) 対照区は不活化していない精子で媒精し、その他の区の精子は紫外線を7,800 ergs/mm²照射して不活化した。

生残率は対照区が88.2%で高温処理していないD-1区は0%であった。処理した区は5.6～9.6%で刺激時間による差がみられなかった。

その半数体症候群発生率は対照区が0%で、処理区では28.8～53.9%で刺激時間と染色体の倍数化との関係は見られなかった。

なお、A～D区の試験は同時に実施できなかったため、用いた卵は各々の試験で別の親から採出した。

温度刺激による第2極体の放出阻止は、アユ卵の染色体を倍数化する場合、低温刺激では受精の4～6分後に60分の処理が有効である。

本試験でも受精の5分後に30～60分の処理が有効であったが、半数体症候群発生率が0%とならず、生残率が使用した親魚によって異なり対照区より低かったことからさらに刺激時間及び卵質についての検討が必要である。

高温刺激については、サケ、マス類では有効であるとの報告はあるが、アユについての報告はない。本試験では受精の5分後に20～60分間の処理で倍数化が図れたが、半数体症候群発生率が高く、アユ卵の染色体倍数化には有効な方法とは考えられない。

要 約

アユの雌性発生を可能にする条件を検討した。

1. アユ精子を遺伝的に不活化するため、紫外線を照射したところ、5,580～7,800 ergs/mm²の照射量が有効であったが、半数体症候群発生率が100%に達しな

ったことから、精液希釈率または照射精液量の検討が必要である。

2. アユ卵の染色体を倍数化するため、温度刺激を与えたところ、0°Cの低温では受精の5分後に30～60分の処理が有効であったが、半数体症候群の発生がみられたり、生残率が低い等の問題が残った。

3. 30°Cの高温では受精の5分後に20～60分の処理で倍数化が図られたが、半数体症候群発生率が高く、アユ卵の倍数化には有効な方法とは思われない。

文 献

- 1) 小野里坦・山羽悦郎 (1983)：紫外線照射によるサケ目魚類4種の雌性発生誘起。日本水産学会誌, 49(5), 693-699。
- 2) 小島将男・岩橋正雄 (1985)：温度ショックによるニジマス染色体の倍数化効果について。新潟県内水面水産試験場調査報告, 12, 39-44。
- 3) 富田政勝 (1985)：ニシキゴイの遺伝に関する研究一Ⅲ。新潟県内水面水産試験場調査報告, 12, 45-50。
- 4) 鈴木亮 (1984)：雌性発生技術でコピーを作る。研究ジャーナル, 8(3), 農林水産技術情報協会, 6-10。
- 5) 谷口順彦・木島明博・深井淳二 (1985)：アユにおける人為倍数体誘導条件の検討。昭和60年日本水産学会春季大会講演要旨。
- 6) 長野県水産試験場 (1985)：温度ショックによるニジマス3倍体の作出について。第10回全国養鱒技術協議会録, 38-46。

淡水魚類の雌性化技術開発

染色体工学手法によるアユの雌性発生—I

高橋 昭夫

近年、魚類の染色体の倍数性を利用する育種技術として卵の染色体を操作し、雌性発生を誘発する研究がサケ、マス類^{1,2}ニシキゴイ³、ドジョウ⁴で行われている。これらの手法を基にしてアユの雌性発生を可能にする条件を検討するため試験を実施した。

材料及び方法

試験に用いたアユ親魚は当场で人工採苗し親魚に養成したもので、精子は成熟した雄魚から搾出法により、卵は排卵後24時間以内の雌魚から搾出法により採取した。媒精後の卵はスライドグラス上に付着、吸水させてから処理した。

精子の運動性の確認は、顕微鏡下のスライドグラス上に精液を滴下後0.1 MNaCl液を加え混合して行った。

以下に試験方法について述べる。

精子不活化：搾取した精液は適量をKcl 強化リンゲル液で100倍に希釈し、予め上記のリンゲル液で1,000倍に希釈したドライウエール液で親水処理し準備しておいた内径9cmのガラスシャーレ内に3cc滴下後、紫外線を照射して不活化を図った。紫外線照射は紫外線照射装置（紫外線ランプGL-10、3灯）を使い、照射距離35cmに固定して、30秒後から30秒間隔に240秒まで8段階を設けて照射量の検討を行った。なお、照射後の精液は精子の活動性をチェックした。

不活化の確認は、照射精液に正常なアユ卵に媒精し、その後の生残率（孵化率）及び半数体症候群発生率（奇形発生率）によって行った。

染色体の倍数化：不活化精子で媒精した卵に温度刺激を与え第2極体の放出を阻止し染色体の倍数化を図った。

温度刺激には低温恒温水槽を用い、刺激水温を0℃（低温区）と30℃（高温区）とし、低温区では刺激の時間と時期を検討するため、受精5分後の卵に10、20、30、35、40、45、50、55、60、70、80分及び90分刺激する区と、刺激時間を60分として刺

激開始を受精の2分後から1分間隔に13分後までにする区で行った。高温区では刺激時間の検討として受精の5分後に20、30、35、40、45、50、55分および60分刺激する区で行った。なお、対照区として通常の精子で受精し温度刺激を与えないで通常発生区を設けた。

倍数化の確認は生残率および半数体症候群発生率によった。

結果と考察

精子不活化：紫外線照射距離を35cmとして照射時間をかえることによって照射量を変えて行った結果を第1表と第1図に示した。

生残率は通常の精子で受精した対照区は83.8%と高率であったが、照射量が1,950 ergs/mm²と低いA-1区は1%以下で照射量が増えると共に生残率は高くなり7,800 ergs/mm²（A-4区）照射で26.7%ともっとも高く、その後は逆に照射量が増すごとに低くなり、13,650 ergs/mm²（A-7区）で0%となった。

半数体症候群発生率は対照区が0%であったがA-2区からA-6区までは85%以上の高率であった。このことは照射量が3,900～11,700 ergs/mm²で精子を不活化できることを示しており、生残率との関係から5,850～7,800 ergs/mm²が有効であり谷口・他の4,815～9,630 ergs/mm²が有効との報告と本試験はほぼ一致した。しかし、半数体症候群発生率が谷口・他では6,420 ergs/mm²で100%に達するとしているが、本試験ではもっとも高い5,850 ergs/mm²で94.2%と、100%に達していないため、精子希釈率及び照射精液量についてさらに検討する必要がある。

染色体の倍数化：低温刺激により第2極体の放出を阻止し卵の染色体を倍数化するため受精の5分後に10～90分の処理により刺激時間を変えて行った結果を第2表と第2図に示した。

生残率は低温処理していないB-1区が21.0%で、処理した区では10分処理のB-2区は4.7%と低い